

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004746

International filing date: 17 March 2005 (17.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-084318  
Filing date: 23 March 2004 (23.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 3 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 4 3 1 8

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
J P 2 0 0 4 - 0 8 4 3 1 8  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 東レ株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	66M00170-A
【提出日】	平成16年 3月23日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	G01N 35/08 G01N 1/00 G01N 25/16
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内
【氏名】	瀧井 有樹
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内
【氏名】	薙野 邦久
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内
【氏名】	中村 史夫
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内
【氏名】	信正 均
【特許出願人】	
【識別番号】	000003159
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
【氏名又は名称】	東レ株式会社
【代表者】	榊原 定征
【電話番号】	047-350-6016
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	005186
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

担体表面に固定化された選択結合性物質に、その選択結合性物質と反応する被検物質を含む溶液を接触させ、該溶液を攪拌する方法であって、下記の 1) 及び 2) の要件を満たす攪拌方法。

- 1) 被検物質を含む溶液に微粒子を添加し、微粒子を移動させることで溶液を攪拌する。
- 2) 担体または／および溶液を保持する容器の構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限されている。

【請求項 2】

選択結合性物質固定化面と、溶液を保持する容器との最短距離が微粒子の最小幅未満となる担体または／および溶液を保持する容器の構造を特徴とする請求項 1 記載の攪拌方法。

【請求項 3】

担体に凹凸部が設けられており、選択結合性物質が凸部上面に固定化され、微粒子は凹部を移動する請求項 1 または 2 に記載の攪拌方法。

【請求項 4】

担体には平坦部と凹凸部が設けられており、複数の凸部上面に選択結合性物質が固定化されており、該凸部上面の高さが略同一であり、かつ、平坦部分と凸部上面との高さの差が  $50\text{ }\mu\text{m}$  以内である請求項 3 に記載の攪拌方法。

【請求項 5】

微粒子を重力、磁力、担体および溶液を保持する容器の振動のいずれか、もしくはこれらの組み合わせで移動させる請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の攪拌方法。

【請求項 6】

微粒子の最大幅が  $10\text{ }\mu\text{m}$  以上凹部と凸部の高さの差以下である請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載の攪拌方法。

【請求項 7】

選択結合性物質が核酸であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の攪拌方法。

【請求項 8】

該選択結合性物質と、該被検物質を反応させることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の攪拌方法。

【請求項 9】

以下の 1)、2) の要件を具備するキット。

- 1) 被検物質が含まれる溶液に添加する微粒子。
- 2) 選択結合性物質が表面に固定化された担体と、被検物質が含まれる溶液を保持する容器であって、これらの構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限される担体と容器。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 反応溶液の攪拌方法とキット

【技術分野】

【0001】

本発明は、被検物質と選択的に結合する物質（本明細書において「選択結合性物質」）を固定化担体と被検物質が含まれる溶液を接触させて、選択結合性物質と被検物質とを反応させる際に、被検物質が含まれる溶液を攪拌する方法に関する。より具体的には、被検物質と選択結合性物質との反応を促進するため微量な被検物質が含まれる溶液を攪拌する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

各種生物の遺伝情報解析の研究が始められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列、また遺伝子配列にコードされる蛋白質およびこれら蛋白質から二次的に作られる糖鎖に関する情報が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子、蛋白質、糖鎖などの高分子体の機能については、各種の方法で調べることができる。主なものとしては、核酸についてはノーザンブロッティング、あるいはサザンブロッティングのような、各種の核酸／核酸間の相補性を利用して各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。蛋白質については、ウエスタンブロッティングに代表されるような、蛋白質／蛋白質間の反応を利用し蛋白質の機能および発現について調べることができる。

【0003】

近年、多数の遺伝子発現を一度に解析する手法としてDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸／核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであり、蛋白質／蛋白質間あるいは糖鎖／糖鎖間や糖鎖／蛋白質間の特異的な反応に基づく蛋白質や糖鎖検出・定量にも応用が可能ではある。これらの技術は、マイクロアレイ又はDNAチップと呼ばれるガラスの平面基板片上に、多数のDNA断片や蛋白質、糖鎖が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。DNAチップ法の具体的使用方法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基板片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を高解像度解析装置で高速に読みとる方法や、電気化学反応にもとづく電流値等の応答を検出する方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。

【0004】

核酸を基板上に固定化するための技術としては、スライドガラス等の平坦な基板の上にポリ-L-リシン、アミノシラン等をコーティングして、スポットターと呼ばれる点着装置を用い、各核酸を固定化する方法などが開発されている（例えば、特許文献1参照）。

【0005】

また、DNAチップに用いられる核酸プローブ（基板上に固定化された核酸）は、従来の数百～数千塩基の長さのcDNAおよびその断片から、検出の際のエラーを下げることに、合成機で容易に合成できるという理由から、核酸プローブとしてオリゴDNA（オリゴDNAとは塩基数が10～100塩基までのものをいう）を用いようとしている。この際、オリゴDNAとガラス基板とを共有結合にて結合させている（例えば特許文献2参照）。

【0006】

現在DNAチップは、チップ上に数万から数千種類の多数の遺伝子を載せ、一度に大量の遺伝子の発現を調べる研究用として用いられていることが多い。また今後、診断用途でのDNAチップが使用されることが期待されている。しかし、診断で使用する場合、一般的に採取できる検体の量が非常に少ないものと予想される。さらに現状、発現量の低い遺

伝子についてはハイブリダイゼーション後の蛍光強度が非常に微弱であり、このような遺伝子は実質上解析できないという問題点を有している。従って、検体が少ない場合や発現量の少ない遺伝子でも、ハイブリダイゼーション後の蛍光の強度をいかに大きくするかということが課題であり、この課題を解決するためには検体DNAとプローブDNAとをいかに効率よく反応させるかがポイントとなる。効率よく検体DNAとプローブを反応させる方法としては、検体の自然拡散では不十分であるので、溶液を攪拌し、効率よくプローブと検体との反応を促進することが考えられている。

#### 【0007】

このように、検体溶液を攪拌する例としては、特許文献3、特許文献4には磁気ビーズを磁力により検体溶液中で動かすことで、検体溶液を攪拌し、検体との反応効率を上げる方法が開示してある。また、特許文献4にはビーズを混合した検体溶液をDNAチップに接触させ、溶液をカバーガラスなどを用いてシーリングし、チップを回転させることにより、ビーズを重力方向に落下させることで検体溶液を攪拌して、ハイブリダイゼーション後のシグナルを大きくする方法が開示してある。

【特許文献1】特表平10-503841号公報（特許請求の範囲）

【特許文献2】特開2001-108683号公報（特許請求の範囲および実施例）

【特許文献3】特開2003-248008号公報（特許請求の範囲および実施例）

【特許文献4】特開2003-339375号公報（特許請求の範囲および実施例）

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

しかし、上記の特許文献3や特許文献4に示した方法では、以下の問題点があった。すなわち、一般に平板状のDNAチップを用いて、通常のカバーガラスで検体溶液をシーリングした場合は、カバーガラスとDNAチップとの隙間は、高々10 $\mu$ m程度である。従って、これより大きい微粒子を添加しても、微粒子の動きが制限されて効果がないといった問題点があった。さらに、大きさ数 $\mu$ m程度の微粒子では、重力で微粒子を移動させようとしても、溶液の抵抗のため検体溶液中で微粒子が十分に移動できず、攪拌の効果を十分に発揮できない問題点があった。また、この微粒子がDNAプローブと接触してしまうことも十分な特性が得られない原因であると推定される。また、Oーリングなどでカバーガラスと、DNAチップとのクリアランスを大きくして、攪拌するための微粒子を大きくし、重力や磁力により反応液中のビーズを動かして溶液を攪拌するという手段もある。しかし、シーリングのためのカバーガラスとDNAチップの両方ともが平坦な形状をしているため、ビーズがDNAプローブが固定化されている部分をも動く。このため、ビーズがプローブDNAを固定化している部分を傷つけてしまい、蛍光をスキャンした際に、傷によりデータ解析に支障を来したり、ビーズがプローブ固定面にぶつかることでプローブが剥がれ落ちたりするため、蛍光のシグナル強度がかえって弱くなったりするといった問題点があった。

#### 【0009】

本発明が解決しようとする課題は、簡便な方法にてビーズで検体溶液を攪拌し、検体とプローブとの反応効率を上げ、かつ、攪拌するビーズでの担体上のプローブDNAの傷つきを防ぎ、反応後の後の検出感度の高い反応溶液の攪拌方法とそのためのキット提供すること。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

すなわち本発明は、担体表面に固定化された選択結合性物質に、その選択結合性物質と反応する被検物質を含む溶液を接触させ、該溶液を攪拌する方法であって、下記の1)及び2)の要件を満たす攪拌方法である。

- 1) 被検物質を含む溶液に微粒子を添加し、微粒子を移動させることで溶液を攪拌する。
- 2) 担体または／および溶液を保持する容器の構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限されている。

#### 【0011】

また、以下の1)、2)の要件を具備するキットである。

1) 被検物質が含まれる溶液に添加する微粒子。

2) 選択結合性物質が表面に固定化された担体と、被検物質が含まれる溶液を保持する容器であって、これらの構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限される担体と容器。

#### 【発明の効果】

#### 【0012】

本発明の方法およびキットにより、ハイブリダイゼーションに代表される、検体と固定化された選択結合性物質との選択的な反応時における、反応を促進し良好なシグナルを得ることができる。また、従来の技術で課題であった、微粒子による傷つきを抑え、さらに、もう一つの問題点である、微粒子による攪拌が不十分であるという点を解決し、高感度なハイブリダイゼーション方法を提供できるものである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

以下、本発明の反応方法について説明する。本発明では、被検物質を含む溶液に微粒子を添加してこれを移動することにより、溶液を攪拌する必要がある。ここで、微粒子の大きさ(微粒子の最大径)として好ましい範囲は $10\mu\text{m}$ 以上のものが好ましく使用可能である。 $10\mu\text{m}$ より小さいと、微粒子による攪拌の効果がほとんど得られないことや、溶液の抵抗により外場(磁場や重力や振動)を加えても微粒子がほとんど動かないことが起こりうる。また、後ほど詳しく述べるが、微粒子の大きさが担体の凹凸もしくは溶液を保持する容器の凹凸の深さより大きいと、ビーズが移動できないので好ましくない。微粒子の形状としては、どのような形の微粒子も用いることができるが、特に好ましくは、球状の微粒子すなわちビーズである。微粒子がビーズであると、これ自体が転がることにより反応液中で滞ることなくスムーズに移動でき、結果的に検体溶液の攪拌が良好に行えるので好ましい。微粒子の形態として最も好ましくは、直径が $20\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ の球状微粒子(ビーズ)を用いることができる。ビーズの直径がこの範囲であると、ビーズ自体の重みで反応液の抵抗があっても、容易に重力により液中をビーズが移動でき、液の攪拌が十分に行えるため、良好な結果を得ることができる。

#### 【0014】

微粒子の材質としては特に限定されないが、金属、ガラス、セラミック、ポリマー(ポリスチレン、ナイロンなど)の微粒子を用いることができる。この中でも、比重が水よりも大きい材質(ガラス、石英、ジルコニアセラミック)のビーズであると重力により容易に液中を移動が可能となるので好ましい。また、いわゆる磁気ビーズを使用することも可能である。

#### 【0015】

さらに本発明の攪拌方法では、担体または／および溶液を保持する容器の構造により、微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限されていることが必要である。このようにすることにより、プローブ固定面に微粒子が当たって、この面を微粒子によって傷つけてしまうということを防ぐことができる。このようなことを実現するための具体的な担体および溶液を保持する容器の形状について、図1を用いて説明する。図1では、1がプローブDNA(選択結合性物質)を示す。また、2が微粒子(この場合はビーズ)であり、3がプローブDNAを固定化した担体を示す。これら1、2、3はターゲットDNA(被検物質)が含まれる溶液に触れることになる。そして4が、例えばスライドガラス、カバーガラスや金属、プラスチックなどの材質からなる液体を保持する容器であり、ターゲットDNAが含まれる溶液はこの容器と担体間で保持されることになる。図1の例では、プローブDNAは担体の凸部に固定化されている。そして、担体の凸部上面(選択結合性物質が固定化された面)と溶液を保持している容器との最短距離が、微粒子の直径未満となっており、微粒子がプローブDNAを固定化している面に触れないようになっており、微粒子がこの面を傷つけることを防いでいる。微粒子が例えば楕円形の場合だと、

凸部上面と容器との最短距離が微粒子の最小幅未満であると、プローブ固定化面と微粒子の接触を防ぐことができる。図1のような状況を具体的に実現する方法としては、凹凸形状を呈する担体の上に、プローブDNAを含む溶液（検体溶液）を滴下して、その液中に凸部上面に微粒子がのらないように微粒子を入れ、それから容器に相当するカバーガラスなどを被せ、その回りを検体溶液がこぼれたり、蒸発してしまわないように粘着テープや、接着剤などでシーリングすればよい。そうすると、カバーガラス上面と凸部上面との間は数 $\mu\text{m}$ 程度の検体溶液が充填されたスペースができる。微粒子の大きさがこれより大きいと、微粒子が凸部上面を傷つけることがない。このような形状の担体を用いて担体を垂直方向に回転させるなどすることにより、微粒子が凹凸部の凹部のみを移動し、微粒子が凸部上面に触れることなく検体溶液を攪拌することができる。なお、凸部上面と容器の間の検体溶液が満たされた空間が確実にできるように、例えば板面の隅を $5\mu\text{m}\sim 20\mu\text{m}$ その他の面より高くする。そして、この板を溶液の保持する容器として用いる方法も好ましく用いることができる。この例を図1の4に示す。このような容器を作製するには、ガラスをふっ酸処理することや、フィルムや粘着テープを貼ることや、スクリーン印刷などで可能である。その他、凸部上面の検体溶液の膜が確実にできるように、Oリングなどを用いて溶液をシーリングすることも用いることができる。

#### 【0016】

ところで、図1では担体が凹凸形状を有していたが、溶液を保持する容器に凹凸形状を設けることによって、同様の効果を得ることも可能である。その具体例を図2に示す。この場合、容器の凸部の下にプローブDNAが配置される。この場合も、プローブDNAが固定化された面と容器凸部との距離が微粒子の最小幅未満とする必要がある。

#### 【0017】

次いで、振動や磁力を与えることや、シーリングされた担体を回転させて重力により、添加した微粒子を検体溶液で移動させ、検体溶液を攪拌する。この中でも担体を回転させることは、簡便に実施できるにもかかわらず、十分な効果が得られることから好ましい。この時の回転速度としては、 $0.1\text{rpm}\sim 30\text{rpm}$ が好ましい。回転速度が $30\text{rpm}$ を越えると、微粒子が一方向に移動しきれないうちに、微粒子に反対側の重力がかかることになる。すなわち、微粒子が検体液中で往復運動する距離が小さくなってしまい、攪拌の効果が十分に発揮できない場合がある。また、 $0.1\text{rpm}$ より回転速度が遅いと、液中の微粒子が移動しているトータルの時間が短くなってしまい、結果的に検体溶液を攪拌している時間が短くなるので十分な効果が得られないことがある。以上の点を鑑みると回転速度の好ましい範囲としては $0.5\text{rpm}\sim 5\text{rpm}$ である。

#### 【0018】

また、我々の検討によると、上記のような検体溶液の攪拌方法をとることにより、ただ単にハイブリダイゼーション後のシグナルが向上するのみでなく、次のような利点もあることが分かった。すなわち、従来のDNAチップのハイブリダイゼーション方法では、ハイブリダイゼーション後の蛍光強度が弱いのみならず、ハイブリダイゼーション後のプローブDNAが固定化されたスポット内の蛍光強度の分布がドーナツ状になってしまい、後のデータ解析に支障をきたすという問題点があった。ところが、上記のような攪拌方法をとることにより、蛍光強度も大きく向上する上に、詳細な理由は不明であるが、上記のようなスポット内のドーナツ状の蛍光強度分布が低減されるといった利点もあることが分かった。

#### 【0019】

次に、選択結合性物質が固定化される基材の好ましい形状について述べる。本発明の選択結合性物質が固定化される基材には凹凸部があり、凸部上面に選択性適合物質が固定化されていることが好ましい。このような構造を取ることにより、検出の際、後述のように非特異的に吸着した検体を検出することがないので、ノイズが小さく、結果的によりS/Nが良好な選択結合性物質が固定化された基材を提供することができる。つまり、本発明の攪拌方法と組み合わせることで、よりS/Nを向上できる。そして、凹凸部の複数の凸部の高さに関しては、凸部の上面の高さが略同一であることが好ましい。ここ



で、高さが略同一とは、多少高さの違う凸部の表面に選択結合性物質を固定化し、これと蛍光標識した被検体とを反応させ、そして、スキャナーでスキャンした際、その信号レベルの強度差が問題とならない高さをいう。具体的に高さが略同一とは、高さの差が $50\mu\text{m}$ より小さいことをいう。さらに本発明の基材には、平坦部が設けられていることが好ましい。具体例を図3、図4に示す。11が平坦部であり、かつ、12で示される凹凸部の凸部上面に選択結合性物質（例えば核酸）が固定化されている。そして、該凹凸部の凸部分の上面が実質的に平坦であることが好ましい。ここで凸部上面が実質的に平坦とは、 $20\mu\text{m}$ 以上の凹凸がないことを意味する。さらに、凹凸部の凸部の上面の高さと平坦部分の高さが略同一であることが好ましい。ここで、平坦部と凹凸部との高さが略同一とは、スキャナーでスキャンした際、その信号レベルの低下具合が問題とならない高さをいう。具体的に高さの差が略同一とは、凹凸部凸部上面の高さと、平坦部の高さとの差が $50\mu\text{m}$ より小さいことをいう。

#### 【0020】

すなわち、一般にDNAチップは、蛍光標識化された検体と基材に固定化された選択結合性物質とを反応させ、スキャナーと呼ばれる装置で蛍光を読みとることが一般的である。スキャナーは励起光であるレーザー光を対物レンズで絞り込み、レーザー光を集光する。この集光された光をDNAチップの表面に照射して、レーザー光の焦点をDNAチップ表面に合わせる。そして、この条件のまま、対物レンズもしくは、DNAチップ自体を走査することによりDNAチップから発生する蛍光を読み込むような仕組みとなっている。

#### 【0021】

このような、スキャナーを用いて本発明の凸部上面に選択結合性物質を固定化した基材をスキャンすると、凹凸部の凹部に非特異的に吸着した検体DNAの蛍光（ノイズ）を検出しがたいという効果を発揮する。この理由は、凸部上面にレーザー光の焦点が合っているため、凹部ではレーザー光がデフォーカスされるからである。逆に言えば、選択結合性物質が固定化された複数の凸部の内、最も高い凸部上面の高さと、最も低い凸部上面の高さの差が $50\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。なぜなら、凸部上面の高さにこれ以上のばらつきがあると、スキャナーの焦点深度の関係で正確な蛍光強度を測定できないことが起こりうるからである。

#### 【0022】

なお、選択結合性物質が固定化された複数の凸部の内、最も高い凸部上面の高さと、最も低い凸部上面の高さの差は、 $50\mu\text{m}$ 以下であれば良いが、 $30\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましく、高さが同一であればなお好ましい。なお、本願でいう同一の高さとは、生産等で発生するばらつきによる誤差も含むものとする。

#### 【0023】

なお、選択結合性物質が固定化された複数の凸部とは、データとして必要な選択結合性物質（例えば核酸）が固定化された部分をいうのであって、ただ単にダミーの選択結合性物質を固定化した部分は除く。

#### 【0024】

また、一般にスキャナーの焦点を調整する方法は、以下の通りである。すなわち、スキャナーがDNAチップの表面に励起光の焦点を合わせる際には、DNAチップの隅で励起光の焦点を合わせるか、図5に示すように、治具にDNAチップを突き当て、レーザー光の焦点をDNAチップ表面に合わせる。そして、その条件のまま、DNAチップ全体をスキャンする。したがって、本発明の担体には、特に凹凸部と平坦部が設けられていることが好ましい。具体例を図3、図4に示す。11が平坦部であり、かつ、12で示される凹凸部の凸部上面に選択結合性物質（例えば核酸）が固定化されている。さらに、凹凸部の凸部の上面の高さと平坦部分の高さの差が $50\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。このようにしておけば、選択結合性物質が固定化された基材をスキャンする場合は、いったん平坦部の上面で励起光の焦点を合わせたり、平坦部を治具に突き当てることが可能である。すなわち、スキャナーの焦点合わせが容易になる。このようにして、平坦部で励起光の焦点を合わせるので、選択結合性物質が固定化された凸部の上面は、平坦であり、かつ、凸部

上面の高さと平坦部の高さの差が $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

#### 【0025】

凸部の上面の高さと平坦部の高さの差が $50\text{ }\mu\text{m}$ より大きいと、以下のような問題点が生じることがある。すなわち、励起光の焦点は平坦部の上面で調整されているので、凸部の上面の高さが異なると、凸部上面での励起光の焦点がぼやけてしまい、最悪の場合、選択結合性物質と検体が反応したことによる蛍光が全く検出されないことが起こりうる。同様なことは、凸部上面と高さが同じ平坦部が設けられていない場合でも起こりうる。

#### 【0026】

また、凸部の上面が平坦でない場合、凸部上面での励起光の焦点の大きさにばらつきが起き、結果的に1つの凸部上面内で検出された蛍光の強さにむらが発生することがある。こうなると、後の解析が困難となるので、凸部の上面は平坦であることが好ましい。

#### 【0027】

なお、凸部の上面の高さと平坦部分の高さの差は、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下であればよいが、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましく、凸部の上面の高さと平坦部分の高さが同一であればなお好ましい。なお、本願でいう同一の高さとは、生産等で発生するばらつきによる誤差も含むものとする。

#### 【0028】

また担体が凹凸状の場合は、平面上の基材に選択結合性物質を点着するのではなく、凹凸部分の凸部上面にのみ選択結合性物質を固定化している。したがって、凸部上面以外の部分に非特異的に検体試料が吸着しても、凸部上面以外の部分では、励起光の焦点がぼやけてるため、望まざる非特異的な吸着をした検体試料からの蛍光を検出することがない。このため、ノイズが小さくなり、結果的にS/Nが良くなるという効果を発揮する。

#### 【0029】

また、凸部の上面の面積は略同一であることが好ましい。このようにすることにより、多種の選択結合性物質が固定化される部分の面積を同一にできるので、後の解析に有利である。ここで、凸部の上部の面積が略同一とは、凸部の中で最も大きい上面面積を、最も小さい上面面積で割った値が1.2以下であることを言う。

#### 【0030】

凸部の上面の面積は、特に限定される物ではないが、選択結合性物質の量を少なくすることができる点とハンドリングの容易さの点から、 $1\text{ mm}^2$ 以下、 $10\text{ }\mu\text{m}^2$ 以上が好ましい。

#### 【0031】

凹凸部における凸部の高さとしては、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下が好ましい。後述する理由から $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $300\text{ }\mu\text{m}$ 以下が特に好ましい。凸部の高さがこれより低いと、スポット以外の部分の非特異的に吸着した検体試料を検出してしまいうことがあり、結果的にS/Nが悪くなることがある。また、凸部の高さが $500\text{ }\mu\text{m}$ 以上であると、凸部が折れて破損しやすいなどの問題が生じる場合がある。

#### 【0032】

上記のような凹凸部が設けられた担体や凹凸部を設けた容器を用いて、微粒子によりターゲットDNAが含まれる検体溶液を攪拌すると、以下のような効果も発揮でき、結果的に、従来技術よりもハイブリダイゼーション後の蛍光強度が強くなる。すなわち、一般的な平板状のDNAチップでカバーガラスをかぶせてハイブリダイゼーションを行った場合は、カバーガラスとDNAチップとの隙間は、高々 $10\text{ }\mu\text{m}$ 程度である。これより大きい微粒子を添加しても、微粒子が動くことができず微粒子を添加した効果がないといった問題点がある。一方、これを避けるために、直径数 $\mu\text{m}$ 程度の微粒子を添加して、重力で微粒子を移動させようとしても、溶液の抵抗のため検体溶液中を微粒子が十分に移動できず、攪拌の効果を十分に発揮できない問題点がある。また、Oリングなどでカバーガラスと、担体との間の距離を大きくし、さらに攪拌するための微粒子を大きくして、十分に攪拌を行おうとすると、微粒子によりチップ表面が傷ついたり、微粒子がプローブ固定面に衝突することで、プローブが脱落してしまうという推定理由のため、ハイブリダイゼーシ

ョン後の蛍光強度が十分に強くないといった問題点がある。ところが、凹凸部を設けた担体や、凹凸部を設けた容器を用いると、図1や図2に示すように、凹凸部の凹部と凸部の高さまでは微粒子の大きさを大きくすることが可能である。従って、大きい微粒子によって検体溶液の十分な攪拌が可能となる上に、プローブDNAの固定化面を傷つけることがないといった好ましい効果を得ることができる。以上を鑑みると、攪拌に用いる微粒子の大きさは $10\mu\text{m}$ 以上が好ましく、担体もしくは溶液を保持する容器の凹部と凸部の高さの差以下にすることが好ましい。微粒子の大きさは $20\mu\text{m}$ 以上が特に好ましい。

#### 【0033】

ついで本発明のキットについて述べる。本発明のキットは、1)被検物質が含まれる溶液に添加する微粒子と、2)選択結合性物質が表面に固定化された担体と、被検物質が含まれる溶液を保持する容器であって、これらの構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限される担体と容器からなる。

#### 【0034】

微粒子については上記で述べた理由により、球状の形状を呈するビーズが好ましく、また、材質としては、金属、ガラス、セラミック、ポリマーなどを用いることができ、その中でもガラス、石英、ジルコニアセラミックが検体溶液中にビーズ成分が溶出することが少ないので好ましく用いることができる。ジルコニアセラミック（イットリア安定化ジルコニア）からなるビーズは、密度が $6\text{g}/\text{cm}^3$ と石英ガラスの $2.2\text{g}/\text{cm}^3$ などに比べて大きいので、攪拌効果がより発揮できたり、容器でシーリングする際の溶液の動きに対しても、ビーズが舞い上がって動いてしまうことが少なくいので、セッティングがより容易に行え、特に好ましく用いることができる。そして、これらのビーズなどの微粒子は被検物質が含まれる溶液に添加して使用する。

#### 【0035】

また、担体については前述したように、この表面にはDNAに代表される選択結合性物質が固定化されている。そして、この担体と容器により微粒子が添加された被検物質が含まれる溶液を保持するのであるが、その際、担体および／もしくは容器の構造により微粒子が選択結合性物質の固定化されている面に触れないようになっていなければならない。その具体的な例は、図1、および図2に示した。これ以外の具体的な例としては、担体と容器の両方の構造が凹凸構造になっている場合が挙げられる。

#### 【0036】

なお、担体の材質については後述する。容器の材質としては、特に限定はされないが、ガラスやポリマーなどを挙げることができる。容器の形状が平板の場合だと、カバーガラスやスライドガラスなどのガラス製の板を好ましく用いることができ、一方、容器の形状が凹凸形状である場合は、ポリメチルメタクリレートやポリカーボネートなどのポリマー材料が、射出成形が可能であり生産性の面から好ましい。そして、これらのキットを用いることで、本発明の反応溶液の攪拌方法をより確実に実施することが可能となる。

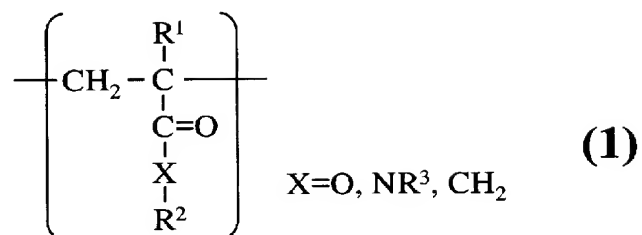
#### 【0037】

担体の材質は、特に限定されたものではないが、ガラスもしくは各種のポリマー（ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート）を用いることができる。選択結合性物質を固定化するため、ガラスの場合だとシランカップリング処理を行うことで官能基を表面に生成でき、これを足がかりにDNAなどの選択結合性物質を担体に固定化することが可能である。例えば、アミノアルキルシランなどを用いて、ガラスの表面にアミノ基を生成でき、DNAの場合だと、このアミノ基のプラスチャージとDNAのマイナスチャージにより静電的な力により固定化することが可能となる。

#### 【0038】

とくに選択結合性物質を固定化するための担体表面が、下記一般式(1)で表す構造単位を含有しているポリマーを有する固体であると、ハイブリダイゼーション後のシグナルがより大きくなることから好ましい。

#### 【0039】



(一般式(1)の $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ は、アルキル基、アリール基もしくは水素原子を表す。)

前記ポリマーとしては、単独重合体あるいは共重合体がいられる。前記ポリマーは、少なくとも一つのタイプのモノマーを原料に用いており、そのモノマーは、重合に関与し得る二重結合および重縮合に関与し得る官能基ならびに、ケトンもしくはカルボン酸またはそれらの誘導体の形態で存在する。また前記ポリマーは、一般式(1)の構造を有することがより好ましい。

#### 【0040】

なお、前記ポリマーが共重合体の場合、一般式(1)で表される構造単位を全モノマー単位の10%以上含有していることが好ましい。一般式(1)で表される構造単位の含有量が10%以上であると、後に説明するようなステップにて、表面に多くのカルボキシル基を生成でき、プローブ核酸を多く固定化できるので、結果的にS/N比がより向上する。

#### 【0041】

本発明において、ポリマーとは、数平均重合度が50以上のものを言う。このポリマーの数平均重合度の好ましい範囲は、100から1万である。特に好ましくは、200以上、5000以下である。なお、数平均重合度はGPC(ゲルパーメイションクロマトグラフ)を用い定法にてポリマーの分子量を測定することにより、容易に測定できる。

#### 【0042】

一般式(1)において、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ はアルキル基、アリール基または水素原子を表し、それぞれ同一であっても異なっても良い。前記アルキル基は直鎖状であってもまたは枝別れしていても良く、好ましくは1から20の炭素数を有する。前記アリール基は、好ましくは6から18、さらに好ましくは6から12の炭素数を有する。官能基XはO、 $\text{NR}^3$ 、または $\text{CH}_2$ の中から任意に選ばれる。 $\text{R}^3$ は前記 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ と同様に定義される官能基である。

#### 【0043】

前記各種のような官能基を含むポリマーで、好ましいものとしては、例えば、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリエチルメタクリレート(PEMA)またはポリプロピルメタクリレートのポリメタクリル酸アルキル(PAMA)等がある。これらの中で特に好ましいものは、ポリメチルメタクリレートである。さらに、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリル酸シクロヘキシルまたはポリメタクリル酸フェニル等も用いることができる。また、前記ポリマーの構成要素を組み合わせた、または前記ポリマーの構成要素に他の一種または複数種のポリマーの構成要素を加えた構造の、共重合体も用いることができる。前記他のポリマーとしては、ポリスチレンがある。

#### 【0044】

共重合体の場合、各構成要素の比の範囲は、カルボニル基を含むモノマー、例えばメタクリル酸アルキルの割合は、10モル%以上が好ましい。こうすることにより、表面に多くのカルボキシル基を生成できプローブ核酸を多く固定化できるので、結果的にS/N比がより向上するからである。ポリマーの構造単位のうち、より好ましい該モノマーの割合は50モル%以上である。

#### 【0045】

一般式(1)で表される構造単位を少なくとも1つ有するポリマーを有する担体を選択

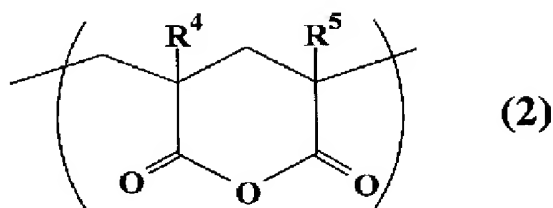
結合性物質を固定化するためには、これに前処理を施して、担体表面にカルボキシル基を形成させることが好ましい。担体表面にカルボキシル基を生成する手段としては、アルカリ、酸などで処理するほか、温水中での超音波処理、酸素プラズマ、アルゴンプラズマ、放射線に担体を晒す方法などが挙げられるが、担体の損傷が少なく、また、容易に実施できるという点からアルカリ、もしくは酸に担体を漬け込んで表面にカルボキシル基を生成させることが好ましい。具体的な例としては、水酸化ナトリウムや硫酸の水溶液（好ましい濃度は、1 N～20 N）に担体を漬け込み、好ましくは30℃から80℃の温度にして、1時間から100時間の間保持すればよい。

【0046】

その他の材質としては、酸無水物単位を有する熱可塑性共重合体を用いることもできる。この熱可塑性共重合体は、(i) 酸無水物単位を有することが好ましい。ここでいう(i) 酸無水物単位は、(A) 熱可塑性共重合体の主鎖や側鎖の骨格中や末端に存在する単位である。(i) 酸無水物単位の構造としては、特に制限はなく、(メタ) アクリル酸無水物単位、グルタル酸無水物単位、マレイン酸無水物単位、イタコン酸無水物単位、シトラコン酸無水物単位、アコニット酸無水物単位等が挙げられるが、マレイン酸無水物単位、グルタル酸無水物単位が好ましく、なかでも、下記一般式(2)

【0047】

【化2】



(上記式中、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>は、同一または相異なる水素原子または炭素数1～5のアルキル基を表す)

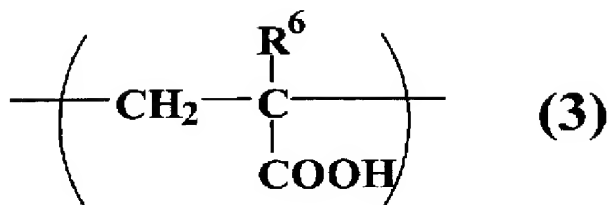
で表されるグルタル酸無水物単位が好ましい。

【0048】

熱可塑性共重合体の構造は、(i) 酸無水物単位を含有していれば特に制限はないが、下記一般式(3)

【0049】

【化3】



(ただし、R<sup>6</sup>は水素又は炭素数1～5のアルキル基を表す)

で表される(ii) 不飽和カルボン酸単位を有していることが好ましい。ここでいう(ii) 不飽和カルボン酸単位とは、不飽和カルボン酸単量体を、共重合することにより得られる単位であり、この際に用いられる不飽和カルボン酸単量体としては特に制限はなく、他のビニル化合物と共重合させることが可能ないずれの不飽和カルボン酸単量体も使用可能である。好ましい不飽和カルボン酸単量体として、下記一般式(4)

【0050】

【化4】



(ただし、 $\text{R}^6$ は水素又は炭素数1～5のアルキル基を表す)

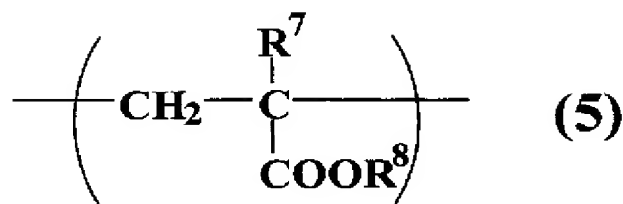
で表される化合物、マレイン酸、及びさらには無水マレイン酸の加水分解物などが挙げられるが、特に熱安定性が優れる点でアクリル酸、メタクリル酸が好ましく、より好ましくはメタクリル酸である。これらはその1種または2種以上用いることができる。

【0051】

(A) 熱可塑性共重合体は、(i) 酸無水物単位を含有していれば特に制限はないが、下記一般式(5)

【0052】

【化5】



(ただし、 $\text{R}^7$ は水素又は炭素数1～5のアルキル基を表し、 $\text{R}^8$ は炭素数1～6の脂肪族若しくは脂環式炭化水素基又は1個以上炭素数以下の数の水酸基若しくはハロゲンで置換された炭素数1～6の脂肪族若しくは脂環式炭化水素基を示す)

で表される(iii) 不飽和カルボン酸アルキルエステル単位を有していることが好ましい。ここでいう(iii) 不飽和カルボン酸アルキルエステル単位とは、不飽和カルボン酸アルキルエステル単量体を、共重合することにより得られる単位であり、ここで、不飽和カルボン酸アルキルエステル単量体としては特に制限はないが、好ましい例として、下記一般式(6)で表されるものを挙げることができる。

【0053】

【化6】



このようにカルボキシル基や酸無水物が担体の表面あれば、アミノ基や水酸基を有する選択結合性物質を担体表面に共有結合で固定化することが可能となる。担体表面にカルボキシル基がある場合には、これらの結合の反応を助長するため、ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホナートなどの様々な縮合剤が用いられている。これらの中でも、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)は、毒性が少ないことや、反応系からの除去が比較的容易なことから、選択結合性物質と担体表面のカルボキシル基との縮合反応にはもっとも有効な縮合剤の1つである。これらEDCなどの縮合剤は、選択結合性物質の溶液と混ぜて使用しても良いし、カルボキシル基が表面に生成された担体を予めEDCの溶液に浸漬しておき、表面のカルボキシル基を活性化しておいても良い。

【0054】

このような縮合剤を用い、担体表面のカルボキシル基と選択結合性物質のアミノ基とを

反応させた場合は、アミド結合により担体表面と選択結合性物質が固定化されることになり、担体表面のカルボキシル基と選択結合性物質の水酸基とを反応させた場合は、エステル結合により担体表面と選択結合性物質とが固定化されることになる。選択結合性物質を含む試料を担体に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～65℃が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

#### 【0055】

一方、酸無水物が表面に存在するポリマーの場合では、上記のような縮合剤を加えても良いし、加えなくとも、例えば選択結合性物質のアミノ基との間で共有結合を行うことが可能である。

#### 【0056】

このように、ポリマー表面に選択結合性物質を固定化することにより、非特異的な検体の吸着を抑え、さらに、共有結合で強固に、かつ、高密度に選択結合性物質を固定化でき、さらに、ガラスに比べ、固定化された選択結合性物質の空間的な自由度が高いという推定理由のために、検体とのハイブリダイゼーション効率が高い担体を得ることができる。

#### 【0057】

ところで、一般式(1)や一般式(2)で示されるような構造単位を含むポリマーで担体を作製する場合、ガラス、セラミック、金属などと比較し、射出成形方法やホットエンボス法などを用いることにより、微細な形状を設けた担体をより簡単に大量生産することが可能である。特に射出成型法は大量生産が容易であることから好ましく用いることができる。

#### 【0058】

上述の方法により得られた選択結合性物質固定化担体は、選択結合性物質を固定した後、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定された選択結合性物質を変性させることもできる。

#### 【0059】

また、選択結合性物質固定化担体は、蛍光標識化された検体と担体に固定化された選択結合性物質とをハイブリダイゼーション反応させ、スキャナーと呼ばれる装置で蛍光を読みとることが一般的である。スキャナーは励起光であるレーザー光を対物レンズで絞り込み、レーザー光を集光する。しかし、担体表面から自家蛍光が生じる場合、その発光がノイズとなり検出精度の低下に繋がる可能性がある。これを防ぐため一般式(1)もしくは一般式(2)の構造単位を有するポリマーに黒色を呈し、またレーザー照射により発光を生じない物質を含有させて表面を黒色にすることにより、担体自身からの自家蛍光を低減させることができるので好ましい。このような担体を用いることにより、検出の際、担体からの自家蛍光を低減できるのでよりノイズが小さく、結果的にS/N比が良好な選択結合性物質物質が固定化された担体を提供することができる。

#### 【0060】

ここで、担体が黒色とは、可視光(波長が400nmから800nm)範囲において、担体の黒色部分の分光反射率が特定のスペクトルパターン(特定のピークなど)を持たず、一様に低い値であり、かつ、担体の黒色部分の分光透過率も、特定のスペクトルパターンを持たず、一様に低い値であることをいう。

#### 【0061】

この分光反射率、分光透過率の値としては、可視光(波長が400nmから800nm)の範囲の分光反射率が7%以下であり、同波長範囲での分光透過率が2%以下であることが好ましい。なお、ここでいう分光反射率は、JIS Z 8722 条件Cに適合した、照明・受光光学系で、担体からの正反射光を取り込んだ場合の分光反射率をいう。

#### 【0062】

黒色にする手段としては、担体に黒色物質を含有させることにより達成しうるが、この黒色物質の好ましいものを挙げると、カーボンブラック、グラファイト、チタンブラック、アニリンブラック、Ru、Mn、Ni、Cr、Fe、CoおよびCuの酸化物、Si、Ti、Ta、ZrおよびCrの炭化物などの黒色物質が使用できる。

#### 【0063】

これらの黒色物質は単独で含有させる他、2種類以上を混合して含有させることもできる。この中の黒色物質の中でも、カーボンブラック、グラファイト、チタンブラックを好ましく含有させることができ、特にカーボンブラックを好ましく用いることができる。

#### 【0064】

また、担体の形状としてガラス、金属などの熱変形をし難い材料からなる支持体層の上に、一般式(1)で表される構造単位を少なくとも1つ有するポリマーからなる選択結合性物質固定化層を設けると、熱や外力による担体の形状変化を防げることから好ましい。この概念の一例を図6に示す。支持体層としては、ポリプロピレンやガラスや、鉄、クロム、ニッケル、チタン、ステンレスなどの金属が好ましい。また、この支持体層と選択結合性物質固定化層との密着性を良くするため、支持体層の表面を、アルゴン、酸素、窒素ガスでのプラズマ処理やシランカップリング剤での処理を施すことが好ましい。このようなシランカップリング剤としては3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランなどが挙げられる。支持体層の上に選択結合性物質固定化層を設ける手段としては、ポリマーを有機溶媒に溶解し、スピンコートやディッピングなどの公知の手段を用いることができる。より簡単には、支持体層に接着剤で貼り付けることもできる。

#### 【0065】

ここで、「選択結合性物質」とは、被検物質と直接的又は間接的に、選択的に結合し得る物質を意味し、代表的な例として、核酸、タンパク質、糖類及び他の抗原性化合物を挙げることができる。核酸は、DNAやRNAでもPNAでもよい。特定の塩基配列を有する一本鎖核酸は、該塩基配列又はその一部と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸と選択的にハイブリダイズして結合するので、本発明でいう「選択結合性物質」に該当する。また、タンパク質としては、抗体及びFabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、抗体の抗原結合性断片、並びに種々の抗原を挙げることができる。抗体やその抗原結合性断片は、対応する抗原と選択的に結合し、抗原は対応する抗体と選択的に結合するので、「選択結合性物質」に該当する。糖類としては、多糖類が好ましく、種々の抗原を挙げることができる。また、タンパク質や糖類以外の抗原性を有する物質を固定化することもできる。本発明に用いる選択結合性物質は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。「選択結合性物質」として、特に好ましいものは、核酸である。この核酸の中でも、オリゴ核酸と呼ばれる、長さが10塩基から100塩基までの核酸は、合成機で容易に人工的に合成が可能であり、また、核酸末端のアミノ基修飾が容易であるため、担体表面への固定化が容易となることから好ましい。さらに、20塩基未満ではハイブリダイゼーションの安定性が低いという観点から20~100塩基がより好ましい。ハイブリダイゼーションの安定性を保持するため、特に好ましくは40~100塩基の範囲である。

#### 【0066】

本発明の担体を用いた測定方法に供せられる被検物質としては、測定すべき核酸、例えば、病原菌やウイルス等の遺伝子や、遺伝病の原因遺伝子等並びにその一部分、抗原性を有する各種生体成分、病原菌やウイルス等に対する抗体等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、これらの被検物質を含む検体としては、血液、血清、血漿、尿、便、髄液、唾液、各種組織液等の体液や、各種飲食物並びにそれらの希釈物等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、被検物質となる核酸は、血液や細胞から常法により抽出した核酸を標識してもよいし、該核酸を鋳型として、PCR等の核酸増幅法によって増幅したものであってもよい。後者の場合には、測定感度を大幅に向上させることが可能である。核酸増幅産物を被検物質とする場合には、蛍光物質等で標識したヌクレオチド三リン酸の存在下で増幅を行うことにより、増幅核酸を標識



することが可能である。また、被検物質が抗原又は抗体の場合には、被検物質である抗原や抗体を常法により直接標識してもよいし、被検物質である抗原又は抗体を選択結合性物質と結合させた後、担体を洗浄し、該抗原又は抗体と抗原抗体反応する標識した抗体又は抗原を反応させ、担体に結合した標識を測定することもできる。

#### 【0067】

固定化物質と被検物質を相互作用させる工程は、従来と全く同様に行うことができる。反応温度及び時間は、ハイブリダイズさせる核酸の鎖長や、免疫反応に関与する抗原及び／又は抗体の種類等に応じて適宜選択されるが、核酸のハイブリダイゼーションの場合、通常、50℃～70℃程度で1分間～十数時間、免疫反応の場合には、通常、室温～40℃程度で1分間～数時間程度である。

#### 【実施例】

#### 【0068】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0069】

##### 実施例1

##### (DNA固定化担体の作製)

公知の方法であるLIGA(Lithographie Galvanoformung Abformung)プロセスを用いて、射出成形用の型を作製し、射出成型法により後述するような形状を有するPMMA製の担体を得た。なお、この実施例で用いたPMMAの平均分子量は15万であり、PMMA中には1重量%の割合で、カーボンブラック(三菱化学製 #3050B)を含有させており、担体は黒色である。この黒色担体の分光反射率と分光透過率を測定したところ、分光反射率は、可視光領域(波長が400nmから800nm)のいずれの波長でも5%以下であり、また、同範囲の波長で、透過率は0.5%以下であった。分光反射率、分光透過率とも、可視光領域において特定のスペクトルパターン(ピークなど)はなく、スペクトルは一様にフラットであった。なお、分光反射率は、JIS Z 8722の条件Cに適合した照明・受光光学系を搭載した装置(ミノルタカメラ製、CM-2002)を用いて、担体からの正反射光を取り込んだ場合の分光反射率を測定した。

#### 【0070】

担体の形状は、大きさが縦76mm、横26mm、厚み1mmであり、担体の中央部分を除き表面は平坦であった。担体の中央には、直径10mm、深さ0.2mmの凹んだ部分が設けてあり、この凹みの中に、直径0.2mm、高さ0.2mmの凸部を64(8×8)箇所設けた。凹凸部分の凸部上面の高さ(64箇所の凸部の高さの平均値)と平坦部分との高さの差を測定したところ、3μm以下であった。また、64個の凸部上面の高さのはらつき(最も高い凸部上面の高さと最も低い凸部上面との高さの差)、さらには、凸部上面の高さの平均値と平坦部上面の高さの差を測定したところそれぞれ3μm以下であった。さらに、凹凸部凸部のピッチ(凸部中央部から隣接した凸部中央部までの距離)は0.6mmであった。

#### 【0071】

上記のPMMA担体を10Nの水酸化ナトリウム水溶液に65℃で12時間浸漬した。これを、純水、0.1NのHCl水溶液、純水の順で洗浄し、担体表面にカルボキシル基を生成した。

#### 【0072】

##### (プローブDNAの固定化)

配列番号1(60塩基、5'末端アミノ化)のDNAを合成した。この配列番号1のDNAは5'末端がアミノ化されている。

#### 【0073】

このDNAを、純水に0.3nmol/μlの濃度で溶かして、ストックソリューションとした。担体に点着する際は、PBS(NaClを8g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>Oを2.9g、KClを0.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を0.2g純水に溶かし1lにメスアップしたも

のに pH 調整用の塩酸を加えたもの、pH 5.5) でプローブ DNA の終濃度を  $0.03 \text{ nmol} / \mu\text{l}$  とし、かつ、担体表面のカルボン酸とプローブ DNA の末端のアミノ基とを縮合させるため、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) を加え、この終濃度を  $50 \text{ mg} / \text{ml}$  とした。そして、これらの混合溶液をガラスキャピラリーで担体凸部上面に点着した。次いで、担体を密閉したプラスチック容器に入れて、 $37^\circ\text{C}$ 、湿度  $100\%$  の条件で 20 時間程度インキュベートして、純水で洗浄した。この反応スキームを図 7 に示す。

#### 【0074】

(検体 DNA の調整)

検体 DNA として、上記 DNA 固定化担体に固定化されたプローブ DNA とハイブリダイズ可能な塩基配列を持つ配列番号 4 の DNA (968 塩基) を用いた。調整方法を以下に示す。

#### 【0075】

配列番号 2 と配列番号 3 の DNA を合成した。これを純水にとかして濃度を  $100 \mu\text{M}$  とした。次いで、pKF3 プラスミド DNA (タカラバイオ (株) 製品番号; 3100) (配列番号 5: 2264 塩基) を用意して、これをテンプレートとし、配列番号 2 および配列番号 3 の DNA をプライマーとして、PCR 反応 (Polymerase Chain Reaction) により増幅を行った。

#### 【0076】

PCR の条件は以下の通りである。すなわち、ExTaq  $2 \mu\text{l}$ 、 $10\times\text{ExBuffer}$   $40 \mu\text{l}$ 、dNTP Mix  $32 \mu\text{l}$  (以上はタカラバイオ (株) 製 製品番号 RR001A に付属)、配列番号 2 の溶液を  $2 \mu\text{l}$ 、配列番号 3 の溶液を  $2 \mu\text{l}$ 、テンプレート (配列番号 5) を  $0.2 \mu\text{l}$  を加え、純水によりトータル  $400 \mu\text{l}$  にメスアップした。これらの混合液を、4 つのマイクロチューブに分け、サーマルサイクラーを用いて PCR 反応を行った。これを、エタノール沈殿により精製し、 $40 \mu\text{l}$  の純水に溶解した。PCR 反応後の溶液の一部をとり電気泳動で確認したところ、増幅した DNA の塩基長は、およそ 960 塩基であり配列番号 4 (968 塩基) が増幅されていることを確認した。

#### 【0077】

次いで、9 塩基のランダムプライマー (タカラバイオ (株) 製; 製品番号 3802) を  $6 \text{ mg} / \text{ml}$  の濃度に溶かし、上記の PCR 反応後精製した DNA 溶液に  $2 \mu\text{l}$  加えた。この溶液を  $100^\circ\text{C}$  に加熱した後、氷上で急冷した。これらに Klenow Fragment (タカラバイオ (株) 製; 製品番号 2140AK) 付属のバッファーを  $5 \mu\text{l}$ 、dNTP 混合物 (dATP、dTTP、dGTP の濃度はそれぞれ  $2.5 \text{ mM}$ 、dCTP の濃度は  $400 \mu\text{M}$ ) を  $2.5 \mu\text{l}$  加えた。さらに、Cy3-dCTP (アマシャムファルマシアバイオテック製; 製品番号 PA53021) を  $2 \mu\text{l}$  加えた。この溶液に  $10 \text{ U}$  の Klenow Fragment を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 20 時間インキュベートし、Cy3 で標識された検体 DNA を得た。なお、標識の際ランダムプライマーを用いたので検体 DNA の長さには、ばらつきがある。最も長い検体 DNA は配列番号 4 (968 塩基) となる。なお、検体 DNA の溶液を取り出して、電気泳動で確認したところ、960 塩基に相当する付近にもっとも強いバンドが現れ、それより短い塩基長に対応する領域に薄くスメアがかかった状態であった。そして、これをエタノール沈殿により精製し、乾燥した。

#### 【0078】

この標識化された検体 DNA を、1 重量% BSA (ウシ血清アルブミン)、 $5\times\text{SSC}$  ( $5\times\text{SSC}$  とは、 $20\times\text{SSC}$  (シグマ製) を純水にて 4 倍に希釈したもの。また、 $20\times\text{SSC}$  を純水で 2 倍に希釈したものを  $10\times\text{SSC}$  と表記し、 $20\times\text{SSC}$  の 2 倍希釈液を  $10\times\text{SSC}$ 、 $100$  倍希釈液を  $0.2\times\text{SSC}$  と表記する。)、 $0.1$  重量% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、 $0.01$  重量% サケ精子 DNA の溶液 (各濃度はいずれも終濃度)、 $400 \mu\text{l}$  に溶解し、ハイブリダイゼーション用のストック溶液とした。

#### 【0079】

以下の実施例、比較例ではハイブリダイゼーションの際の検体溶液は、上記で調整した

ストック溶液を、1重量%BSA、5×SSC、0.01重量%サケ精子DNA、0.1重量%SDSの溶液（各濃度はいずれも終濃度）で200倍に希釈したものをを用いた。

#### 【0080】

（ガラスビーズの修飾）

直径が150 $\mu$ mのガラスビーズ10gを10N NaOH溶液に浸漬した後、純水で洗浄した。ついで、APS（3-アミノプロピルトリエトキシシラン；信越化学工業（株）製）を2重量%の割合で純水に溶解した後、上記のガラスビーズを1時間浸漬し、この溶液から取り出した後に110℃で10分間乾燥した。このようにして、ガラスビーズの表面にアミノ基を導入した。

#### 【0081】

ついで、5.5gの無水コハク酸を1-メチル-2-ピロリドン335mlに溶解させた。1Mの50mlのホウ酸ナトリウム（ホウ酸3.09gとpH調整用の水酸化ナトリウムを加えて、純水で50mlにメスアップしたもの。pH8.0）に上記コハク酸溶液に加えた。この混合液に上記のガラスビーズを20分間浸漬した。浸漬後、純水で洗浄および乾燥した。このようにして、ガラスビーズの表面のアミノ基と無水コハク酸を反応させて、ガラスビーズ表面にカルボキシル基を導入した。

#### 【0082】

（ハイブリダイゼーション）

上記で得られたプローブDNAを固定化した担体に上記検体DNAをハイブリダイゼーションさせた。具体的には、先に用意したプローブ核酸が凸部に固定化されている担体にハイブリダイゼーション用の溶液を50 $\mu$ l滴下し、担体凹部に上記の修飾を施したガラスビーズ2mgを添加し、その上にカバーガラスをかぶせた。また、カバーガラスの周りをペーパーボンドでシールし、ハイブリダイゼーションの溶液が乾燥しないようにした。このカバーガラス面には、その4辺のうち、向かい合う2辺に厚さ8 $\mu$ m、幅1mmのフォトレジストをフォトリソグラフィーにより形成した物を用いた。こうすることでハイブリダイゼーション時、担体凸部とカバーガラスの距離（ギャップ）を8 $\mu$ mとできる。これをマイクロチューブローター（アズワン製、商品番号：1-4096-01）の回転面に設けたプラスチック容器内に固定し、65℃、湿度100%の条件で10時間インキュベートした。その際、ローターの回転数は3rpmとし、ローターの回転面がプローブDNA固定化面に対し垂直方向になるようにした。インキュベート後、カバーガラスを剥離後に洗浄、乾燥した。

#### 【0083】

（測定）

DNAチップ用のスキャナー（Axon Instruments社のGenePix 4000B）に上記処理後の基材をセットし、レーザー出力33%、フォトマルチプライヤーの電圧設定を500にした状態で測定を行った。その結果を表1に示す。ここで、蛍光強度とはスポット内の蛍光強度の平均値である。

#### 【0084】

なお、本実施例では、ガラスビーズを用いたが、セラミックビーズ、テフロン（登録商標）ビーズを用いても表1とほぼ同様の結果が得られた。

#### 【0085】

比較例1

ガラスビーズを入れない場合の実験を行った。実験手順はハイブリダイゼーションの際にガラスビーズを添加しないこと以外は実施例1と同様に行った。結果を表1に示す。

#### 【0086】

実施例1と比べて蛍光強度が低いことが確認できた。さらに、理由は定かではないが、この比較例においては、担体凸部の蛍光強度分布が不均一（ドーナツ状分布）であるのに対し、実施例1の結果は、担体凸部の蛍光強度分布がほぼ均一であった。

#### 【0087】

比較例2

凹凸部が設けられていない平坦なP MMA担体の場合の実験を行った。実験手順は、（１）平坦な担体を用いたこと、（２）プローブDNAの点着を専用機（日本レーザー電子（株）製、ジーンスタンプII）で行ったこと、（３）さらに、カバーガラス面の４辺に厚み200 $\mu$ m、幅1mmのポリエステルフィルムを貼り付け、ビーズ攪拌が行えるように担体とカバーガラスの間に隙間を設けて、この隙間にビーズと検体溶液を添加してハイブリダイゼーションを行った以外は、実施例1と同様に行った。結果を表1に示す。実施例1と比較すると蛍光強度が低いことが分かる。さらに、実施例1では見られなかったスポットの傷つきが確認された。これは、ハイブリダイゼーション時にビーズがプローブ固定化面を傷つけたことが原因であるものと推定された。

【0088】

比較例3

実施例1でカバーガラスにポリマーを形成する代わりにシリコンシート（厚さ、200 $\mu$ m）を貼り付けたものを用いて実施例1と同様の実験を行った。ただし、ハイブリダイゼーション用の溶液は70 $\mu$ l滴下した。ギャップの厚みが200 $\mu$ mであり、かつビーズの大きさが150 $\mu$ mであるため、プローブDNA固定面にビーズが触れることになる。結果を表1に示す。実施例1と比べて蛍光強度が低いことが分かる。これは、攪拌時にビーズがプローブDNAの固定化面に接触し、プローブDNAに悪影響を及ぼしたためである。

【0089】

参考例1

凹凸部が設けられていない平坦なP MMA担体であり、かつ、ビーズで攪拌を行わない場合の実験を行った。ハイブリダイゼーション溶液にビーズを添加せず、回転を行わなかった以外は、比較例2と同様な操作・測定を行った。結果を表1に示す。

【0090】

【表1】

表1

	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	参考例1
ターゲット濃度	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200
基板形状	凹凸	凹凸	平板	凹凸	平板
ギャップ( $\mu$ m)	8	8	8	200	8
ビーズ	有	なし	有	有	なし
回転	有	有	有	有	なし
蛍光強度	12000	2900	3900	4000	700

以上より比較例でもビーズで検体溶液を攪拌した効果は得られるものの、実施例に比べ劣っていることが分かる。

【0091】

実施例2

実施例1においてガラスビーズのサイズを5種類選択して実験した。実験手順は、実施例1と同様で、ガラスビーズの直径サイズを10、20、50、100、200 $\mu$ mで行った。結果を表2に示す。

【0092】

比較例4

ガラスビーズの直径サイズを1 $\mu$ m、300 $\mu$ m、400 $\mu$ mとした以外は実施例2と同様な実験を行った。その結果を表2に示す。

【0093】

【表 2】

表2								
	比較例4	実施例2					比較例4	
サイズ( $\mu\text{m}$ )	1	10	20	50	100	200	300	400
蛍光強度	3500	8200	10500	12700	12000	12500	3100	3000

以上より、 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ のビーズを用いると攪拌効果が明らかに見られたが、 $300$ 、 $400 \mu\text{m}$ のビーズでは顕著な効果は得られなかった。これは、担体凹部とカバーガラスの距離が $208 \mu\text{m}$ であり、 $300$ 、 $400 \mu\text{m}$ のビーズを半ば強引にセットしたため、カバーガラスと担体に挟まってしまい、移動できなかったからである。また、 $1 \mu\text{m}$ のビーズについては、ハイブリダイゼーションの溶液の抵抗によりビーズが移動しづらいことが認められたことと、プローブDNA固定面に接触するため、何らかの悪影響を及ぼしていることが特性劣化の原因と推定される。本実施例・比較例より、ビーズの大きさの好ましい大きさは $10 \mu\text{m}$ 以上であり、より好ましくは $20 \mu\text{m}$ 以上であることが分かる。

## 【0094】

## 実施例 3

実施例 1 の担体の形状が、次の特徴を持つ担体で実施例 2 と同様の実験を行った。担体の中央には、直径 $10 \text{ mm}$ 、深さ $0.3 \text{ mm}$ の凹んだ部分が設けてあり、この凹みの中に、直径 $0.2 \text{ mm}$ 、高さ $0.3 \text{ mm}$ の凸部を $64 (8 \times 8)$ 箇所設けた。その他の担体の特徴や実験の手順は、実施例 1 と同様である。また、ガラスビーズの直径サイズを $10$ 、 $20$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $300 \mu\text{m}$ とした。結果を表 3 に示す。

## 【0095】

## 比較例 5

ガラスビーズの直径サイズを $1 \mu\text{m}$ 、 $400 \mu\text{m}$ とした以外は実施例 2 と同様な実験を行った。その結果を表 3 に示す。

## 【0096】

## 【表 3】

表3								
	比較例5	実施例3						比較例5
サイズ( $\mu\text{m}$ )	1	10	20	50	100	200	300	400
蛍光強度	3200	8800	11000	13000	12000	12700	12000	2700

$10 \sim 300 \mu\text{m}$ のビーズを用いると攪拌効果が明らかに見られたが、 $400 \mu\text{m}$ のビーズでは顕著な効果は得られなかった。これは、担体凹部とカバーガラスの距離が $308 \mu\text{m}$ であり $400 \mu\text{m}$ のビーズを半ば強引にセットしたため、カバーガラスと担体に挟まってしまいビーズが移動できなかったからである。その他、 $1 \mu\text{m}$ のビーズについては、ハイブリダイゼーションの溶液の抵抗によりビーズが移動しづらいことが認められたことと、プローブDNA固定面に接触するため、何らかの悪影響を及ぼしていることが特性劣化の原因と推定される。また、本実施例・比較例より、ビーズの大きさの好ましい大きさは、 $10 \mu\text{m}$ 以上であり、より好ましくは、 $20 \mu\text{m}$ 以上であることが分かる。

## 【0097】

## 実施例 4

凸部の高さがばらついた場合について実験を行った。実施例 1 で用いたPMMAの射出成形品の凸部をラッピングペーパーで削り、凸部上面の高さに差を設けた。すなわち、他の凸部上面（基準となる凸部）よりも、 $30 \mu\text{m}$ 低い凸部（4箇所）がある担体（担体ア）、他の凸部上面よりも、 $50 \mu\text{m}$ 低い凸部（4箇所）がある担体（担体イ）をそれぞれ作製した。なお、これら担体の低い部分以外の凸部（基準となる凸部）上面の高さと、平坦部分の高さの差は $3 \mu\text{m}$ 以下であった。実施例 1 と同様に、点着するプローブDNAの調整を行った。ついで、基準となる凸部上面に4箇所、低い凸部上面に4箇所にプローブDNA溶液の点着を実施例 1 と同様に行い、さらに、ハイブリダイゼーション用の検体DNAの調整を実施例 1 と同様に行った。ハイブリダイゼーションと測定も実施例 1 と同様

に行った。基準となる凸部上面の蛍光強度の平均値、高さが低い凸部上面の蛍光強度の平均値を表4に示す。

【0098】

【表4】

	表4			
	実施例4			
	担体ア		担体イ	
	基準となる凸部	30 $\mu$ m低い凸部	基準となる凸部	50 $\mu$ m低い凸部
蛍光強度	13000	12000	12600	8900

このように、凸部の高さにばらつき（50 $\mu$ m以下）があっても、実施例1、2と同等の蛍光強度がえられていることが分かる。

【0099】

実施例5

凸部上面と平坦部の差がある場合について検討した。実施例4で用いたP MMAの射出成形品の平坦部をラッピングペーパーで削り、平坦部上面と凸部上面の高さの差が30 $\mu$ m（担体ウ）、50 $\mu$ m（担体エ）の2種類の担体を作製した。すなわち、担体ウは凸部の高さが平坦部の高さより30 $\mu$ m高いことになる。実験手順は、実施例1と同様に、点着するプローブDNAの調整、凸部上面へのプローブDNA溶液の点着、検体DNAの調整、ガラスビーズの修飾を行った。ハイブリダイゼーションは、実施例1でカバーガラスにポリマーを形成する代わりにシリコンシート（厚さ、60 $\mu$ m）を貼り付けたものを用いて行った。なお、上面にDNA溶液をスポットした凸部はそれぞれの担体について4カ所である。そして、DNAを点着したスポット（4カ所）の蛍光強度の平均値を求めた。その結果を表5に示す。

【0100】

【表5】

	表5	
	実施例5	
	担体ウ	担体エ
蛍光強度	11500	8700

このように、平坦部上面と凸部上面との高さに差（50 $\mu$ m以下）があっても、実施例1と同等の蛍光強度がえられていることが分かる。

【0101】

実施例6

実施例1でカバーガラスとペーパーボンドでシールした基板をボルテックス（Scientific Industries, Inc. 製）にセットし、振動でガラスビーズを移動させハイブリダイゼーション攪拌した場合の実験を行った。実験手順は、ローテーターの代わりにボルテックスにセットすること以外、実施例1と同様に行った。結果を表6に示す。実施例1には劣るが、攪拌の効果が見られ強い蛍光強度を示した。実施例1が優れる理由は、振動を与えてビーズを移動するよりも、基板を回転させてビーズを移動させる方が、よりビーズの移動距離を大きくできるためであると考えられる。

【0102】

実施例7

ハイブリダイゼーション時に磁性ビーズを添加し、周りの磁場を変化させることで磁性ビーズを移動させハイブリダイゼーション溶液を攪拌する実験を行った。まず、図8のような磁石が往復運動する機器を自作した。実験手順は、（DNA固定化担体の作製）（プローブDNAの固定化）（検体DNAの調整）（測定）は、実施例1と同様に行った。ハイブリダイゼーションは、ガラスビーズの代わりに磁性ビーズ（トライアル株式会社製）直径50 $\mu$ mを1mgを担体凹部に添加したことで、ローテーターの代わりに前述の自作

機にセットしたこと以外、実施例 1 と同様に行った。結果を表 6 に示す。実施例 1 には劣るが、強い蛍光強度を示した。実施例 1 の方が優れる理由は、本実施例では磁気ビーズの移動が基板凹部の底面付近に限定され、実施例 1 のガラスビーズの移動範囲よりも狭いためであると考えられる。

【 0 1 0 3 】

【表 6】

表6		
	実施例6	実施例7
ビーズ種	ガラス	磁性体
外力	振動	磁力
蛍光強度	9900	7800

実施例 8

ビーズをイットリア安定化ジルコニア（ジルコニアにイットリアを 2．5 m o l % の割合で混合したもの）製で、直径が 1 2 5 μ m のものを用いた以外は、実施例 1 と同様の実験を行った。その結果、ハイブリダイゼーション後の蛍光強度についてはほぼ同じであった。しかし、ビーズ 2 m g を添加し、その上にカバーガラスを被せる際の溶液の動きに対してもビーズが移動し難く、セッティングが容易であった。これは、ジルコニアビーズの比重が 6．0 5 g ／ c m 3 とガラスに対して 3 倍近くの比重があるためである。

【 0 1 0 4 】

SEQUENCE LISTING

<110> 東レ株式会社

<120> 反応溶液の攪拌方法とキット

<130> 66M00170

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Plasmid pKF3

<400> 1

acatttttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcattctgga 60

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Plasmid pKF3

<400> 2

gggcgaagaa gttgtccata 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Plasmid pKF3

<400> 3

gcagagcgag gtatgtaggc 20

<210> 4

<211> 968

<212> DNA

<213> Plasmid pKF3

<400> 4

gggcgaagaa gttgtccata ttagccacgt ttaaataaaa actggtgaaa ctcacccagg 60

gattggcctga	gacgaaaaaac	atatttctcaa	taaacccttt	agggaaatag	gccagggtttt	120
caccgtaaca	cgccacatct	tgcgaatata	tgtgtagaaa	ctgccggaaa	tcgtcgttgt	180
attcactcca	gagcgatgaa	aacgtttcag	tttgcctcatg	gaaaacgggtg	taacaagggt	240
gaacactatc	ccatatcacc	agctcaccgt	ctttcattgc	catacgaaat	tcggtatgag	300
cattcatcag	gcgggcaaga	atgtgaataa	aggccggata	aaacttgtgc	ttatTTTTtct	360
ttacgggtctt	taaaaaggcc	gtaatatcca	gatgaacgggt	ctggttatag	gtacattgag	420
caactgactg	aaatgcctca	aaatgtttctt	tacgatgcc	ttgggatata	tcaacgggtgg	480
tatatccagt	gatttttttct	tccatttttag	cttcccttagc	tcctgaaaat	ctcgataact	540
caaaaaatac	gcccggtagt	gatcttattt	cattatgggtg	aaagttaggaa	cctctttacgt	600
gccgatcaac	gtctcatttt	cgccaaaagt	tggcccagggt	cttcccggta	tcaacaggga	660
caccaggatt	tattttattct	gcgaagtgat	cttccgttcg	acggagttcc	actgagcgtc	720
agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	780
ctgcttgcaa	acaaaaaaac	caccgctacc	agcgggtgggt	tgtttgccgg	atcaagagct	840
accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgtcct	900
tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	960
cgctctgc						968

<210> 5

<211> 2246

<212> DNA

<213> Plasmid pKF3

<400> 5

atggcaacag	tcaatcagct	ggttcgaaaag	ccgcgagctc	gtaaaagtggc	caaatctaac	60
gttccggctc	tcgaggcatg	cccgtagaag	cgtggcatat	gcacacgcgt	atacactact	120
actccgaaga	aaccgaattc	agcgcctgcgc	aagctttggc	gcgtacgcct	gaccaacgggt	180
ttcgaggtea	cctcatatat	aggtggtgaa	ggacacaacc	tgcaggaaaca	ctctgtttatc	240
ctgatcagag	gcggccgcgt	taaagatctg	cccgggatcc	ggtaccacac	cgctccgcggc	300
gctctagact	gctccggagt	aaaggaccgt	cgacaggatc	gatcgaaata	cgggtgtaaaa	360
cgteccgaagg	cctaatagaa	gctagcttgg	cactgggcca	agctgaattt	ctgccattca	420
tccgcttatt	atcacttatt	caggcgtagc	accaggcggt	taagggcacc	aataactgcc	480
ttaaaaaaat	tacgccccgc	cctgccactc	atcgcagtac	tgttgtaatt	cattaagcat	540
tctgccgaca	tggaaagccat	cacagacggc	atgatgaacc	tgaatcgcca	gcggcatcag	600
caccttgctc	ccttgcgat	aatatttgcc	catagtga	acggggggcga	agaagttgtc	660
catattagcc	acgttttaa	caaaactgggt	gaaactcacc	cagggtattgg	ctgagacgaa	720
aaacatatc	tcaataaaac	ctttagggaa	ataggccagg	ttttcacctg	aacacgccac	780
atcttgcgaa	tatatgtgta	gaaactgcgc	gaaatcgctc	tggatattcac	tccagagcga	840
tgaaaacgtt	tcagtttgct	catggaaaac	ggtgtaacaa	gggtgaacac	tatcccatat	900
caccagctca	ccgtctttca	ttgccatacg	aaattccgta	tgagcattca	tcaggcggggc	960
aagaatgtga	ataaaggccg	gataaaactt	gtgcttattt	ttcttttacgg	tctttaaaaa	1020
ggccgtaata	tccagatgaa	cggctctgggt	atagggtacat	tgagcaactg	actgaaatgc	1080
ctcaaaatgt	tctttacgat	gccattggga	tatatcaacg	gtggtatatc	cagtgttttt	1140
tttctccatt	ttagcttccct	tagctcctga	aaatctcgat	aactcaaaaa	atacgcccggt	1200
tagtgatctt	atttcattat	ggtgaaagtt	ggaacctctt	acgtgccgat	caacgtctca	1260
ttttcgccaa	aagttggccc	agggtctccc	ggtatcaaca	gggacaccag	gatttatttta	1320
ttctgcgaag	tgatcttccg	ttcgacggag	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaaag	1380
atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	1440
aaaccacgc	taccagcgggt	ggtttgtttg	cgggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	1500
aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	1560
ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgttagca	cggcctacat	acctcgctct	gctaattcctg	1620
ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttgga	ctcaagacga	1680
tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	1740



```

ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc 1800
acgcttcccg aaggagagaaa ggcggaacagg tatccggtaa gcggcaggggt cggaacagga 1860
gagcgcacga gggagcttcc aggggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc tgtcgggttt 1920
cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg gagcctatgg 1980
aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac 2040
atgttctttc ctgcgttate ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 2100
gctgataacc ctgcgcgcag ccgaacgacc gagcgccagcg agtcagtgag cgaggaagcg 2160
gaagaagcat tctgaaatga gctgttgaca attaatcacc gaactagtta actagtacgc 2220
aagttcacgt aaaaagggtg tcgacc 2246

```

# 【図面の簡単な説明】

## 【0105】

【図1】 本発明の実施形態の断面模式図

【図2】 本発明の実施形態の断面模式図

【図3】 担体の模式図

【図4】 担体の断面模式図

【図5】 DNAチップ突き当て治具の例

【図6】 担体を支持体層／選択結合性物質固定化層とした場合の概念図

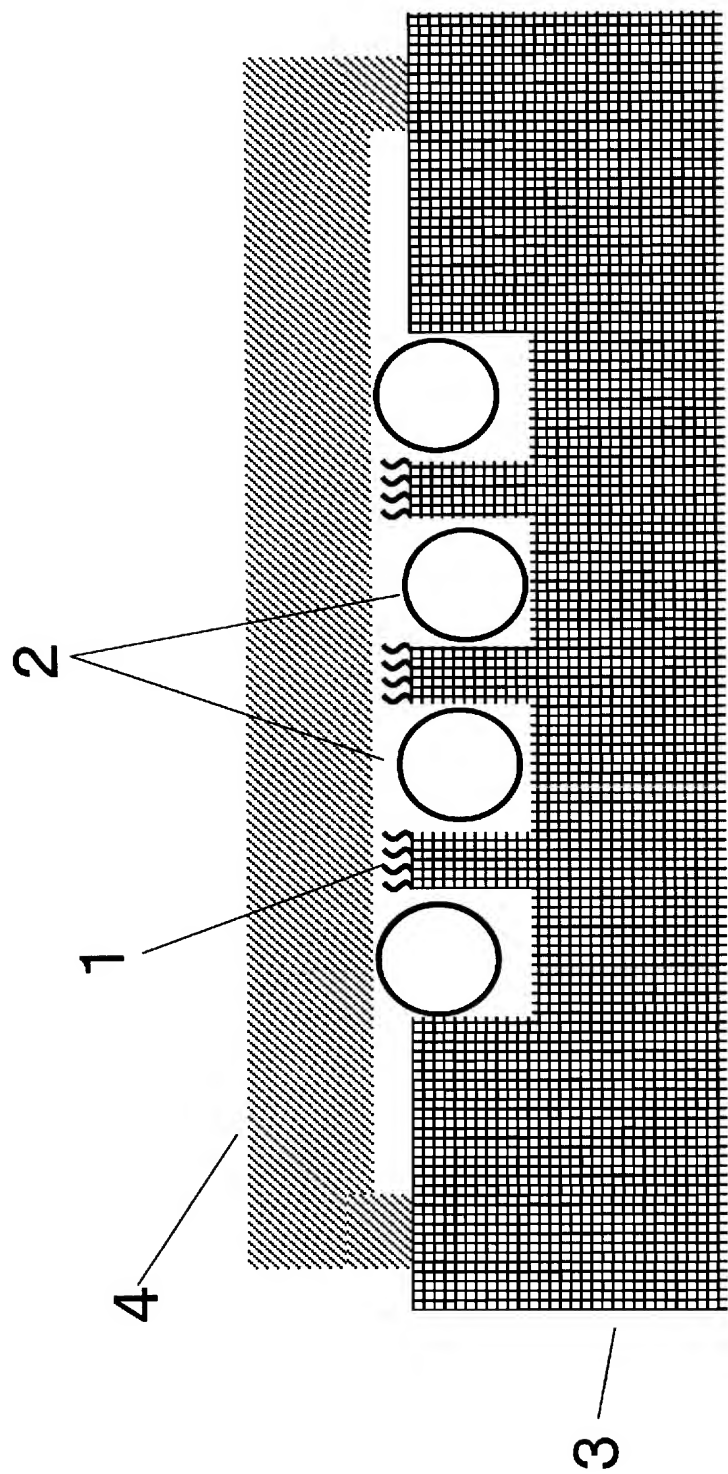
【図7】 PMMA表面に選択結合性物質を固定化する際の反応スキーム

【図8】 実施例7で用いた治具の概念図

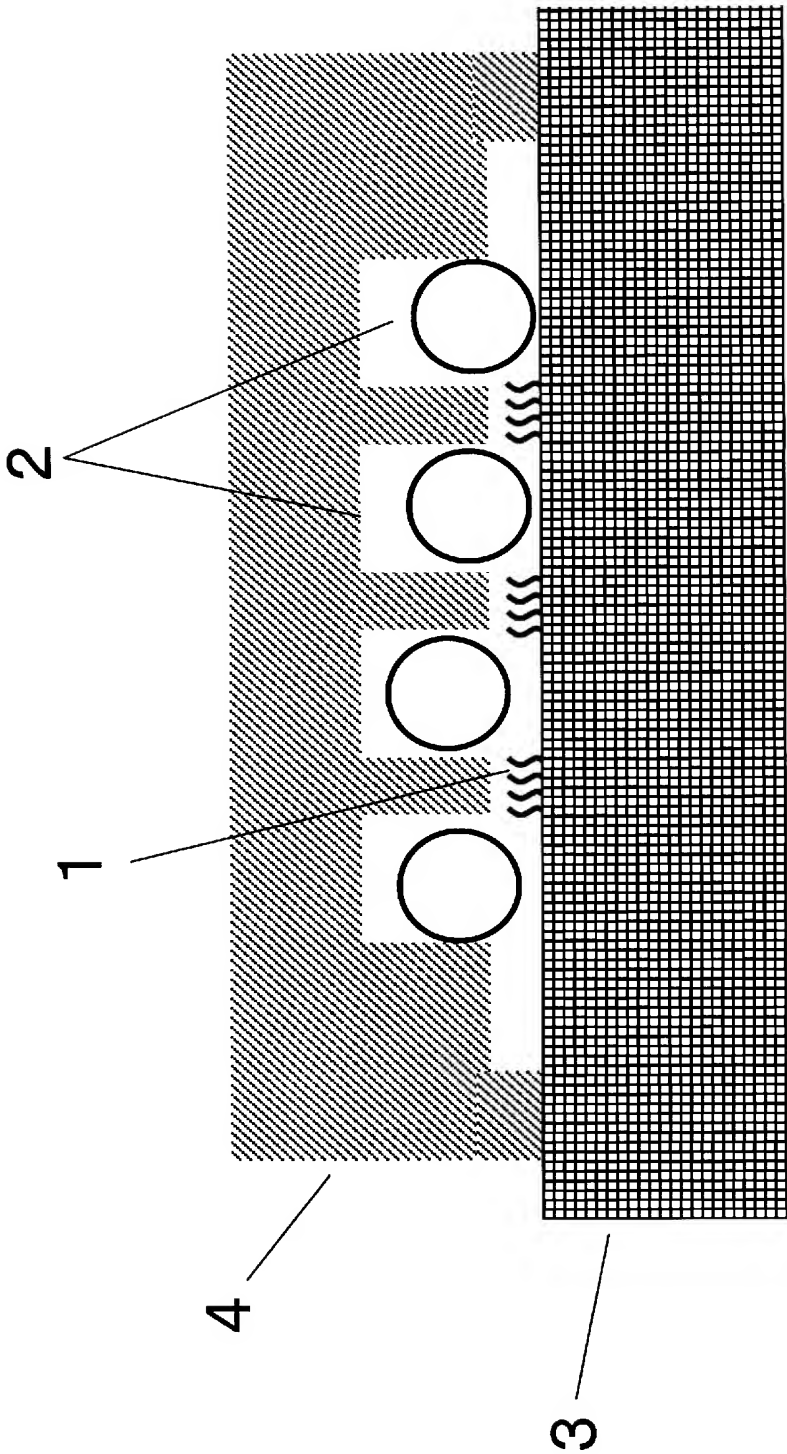
## 【符号の説明】

## 【0106】

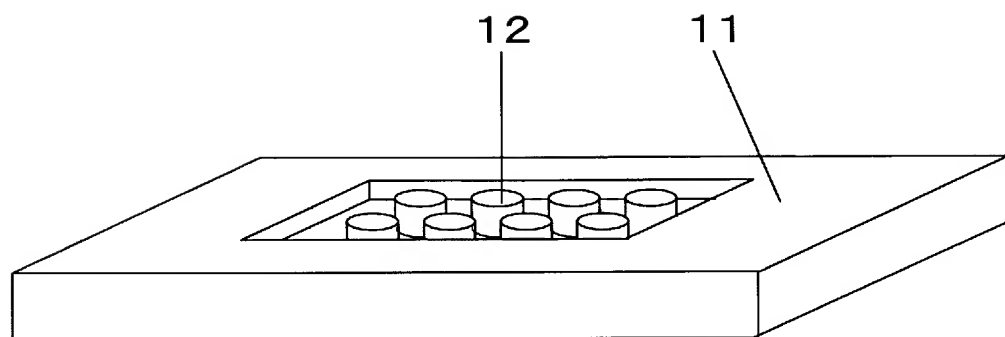
- 1 担体に固定化された選択結合性物質（DNA）
- 2 微粒子（ビーズ）
- 3 担体
- 4 反応溶液を保持する容器
- 11 平坦部
- 12 凹凸部
- 13 DNAチップ
- 14 対物レンズ
- 15 レーザー励起光
- 16 マイクロアレイを治具に突き当てるためのバネ
- 31 選択結合性物質固定化層
- 32 支持体層
- 41 PMMA
- 42 DNA
- 51 磁石
- 52 磁石の往復運動の方向
- 53 基板



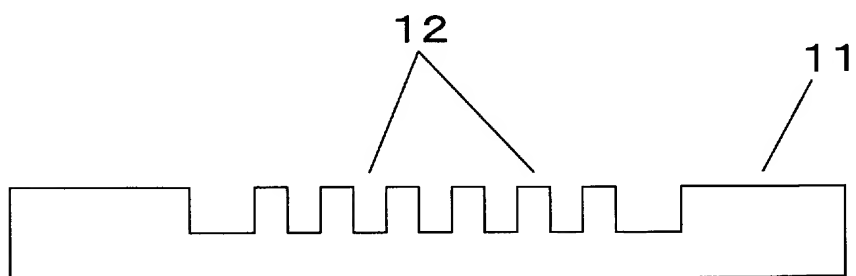
【图 2】



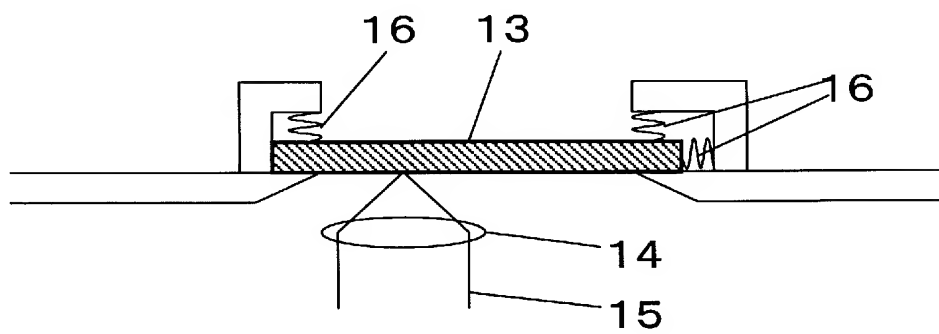
【図 3】



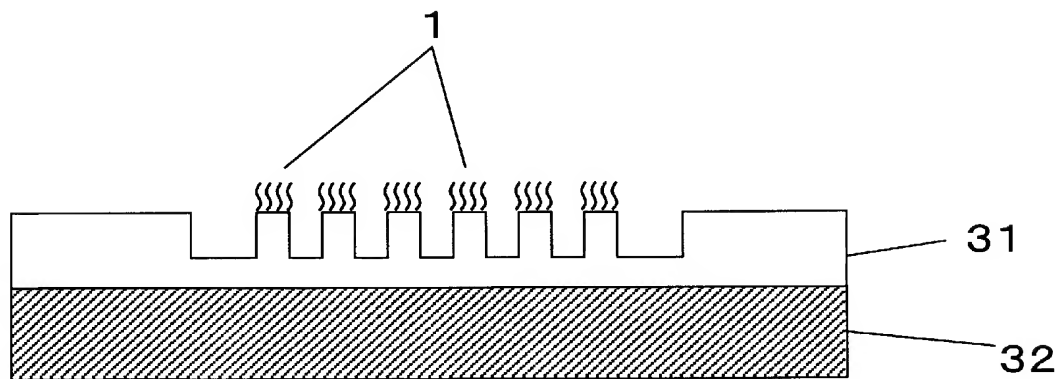
【図 4】



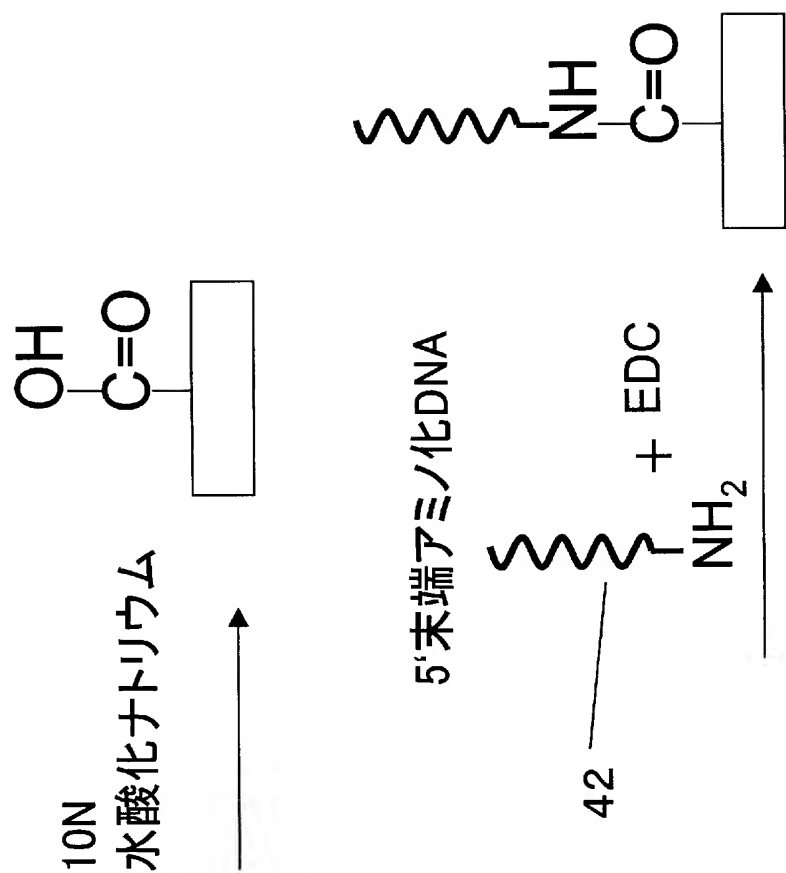
【図 5】



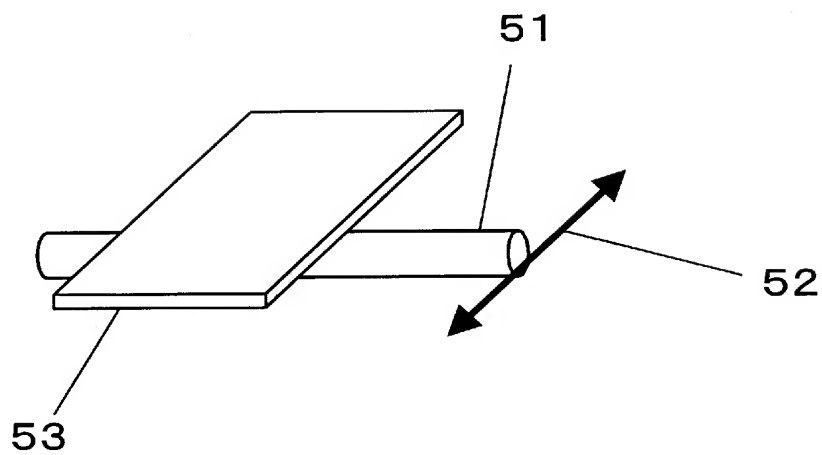
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明が解決しようとする課題は、簡便な方法にてビーズで検体溶液を攪拌し、検体とプローブとの反応効率を上げ、かつ、攪拌するビーズでの担体上のプローブ DNA の傷つきを防ぎ、反応後の後の検出感度の高い反応溶液の攪拌方法とキット提供する。

【解決手段】 本発明は、担体表面に固定化された選択結合性物質に、その選択結合性物質と反応する被検物質を含む溶液を接触させ、選択結合性物質と被検物質を反応させる方法であって、被検物質を含む溶液に微粒子を添加し、微粒子を移動させることで溶液を攪拌し、担体または／および溶液を保持する容器の構造により微粒子の移動領域が選択結合性物質固定化表面以外に制限されている。

【選択図】 なし

## 出願人履歴

0 0 0 0 0 3 1 5 9

20021025

住所変更

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

東レ株式会社